

Ghrelin在绵羊体内卵母细胞和早期胚胎的表达

杜晨光¹, 杨燕燕¹, 李海军², 鲍庆江¹, 郭宏儒¹, 曹贵方^{1,*}

(1. 内蒙古农业大学 动物科技与医学学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要: 为了明确ghrelin是否参与了卵母细胞成熟及胚胎早期发育进程, 本研究利用免疫荧光技术和实时定量RT-PCR技术检测了绵羊卵母细胞和体内早期胚胎中ghrelin蛋白的表达定位和ghrelin mRNA水平相对表达变化规律。免疫荧光染色结果表明, ghrelin蛋白主要分布于卵母细胞胞质内; 实时定量RT-PCR结果揭示绵羊卵母细胞和早期胚胎ghrelin mRNA的相对表达量依据发育阶段的不同而呈现一定变化规律, 即在成熟卵母细胞, 2细胞胚胎期和8细胞胚胎期显著高于未成熟卵母细胞和4细胞胚胎期 ($P<0.05$), 囊胚期表达量最高。卵母细胞和早期胚胎中ghrelin蛋白的表达及ghrelin mRNA特定的表达模式, 揭示这一新型分子在绵羊卵母细胞成熟以及胚胎早期发育过程中具有潜在的调控作用。

关键词: Ghrelin; 绵羊卵母细胞; 胚胎; 实时定量 RT-PCR; 免疫荧光染色

中图分类号: Q786; Q Q344.13; Q Q344.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)02-0134-05

Expression of the Ghrelin in Sheep Oocytes and Pre-implantation Embryos Produced *in vivo*

DU Chen-guang¹, YANG Yan-yan¹, LI Hai-jun², BAO Qing-jiang¹,
GUO Hong-ru¹, CAO Gui-fang^{1,*}

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; 2. Key Laboratory of Education Ministry of China for Research of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology of Inner Mongolia University, Hohhot 010021)

Abstract: The possibility of ghrelin expressed in sheep oocytes and pre-implantation embryos produced *in vivo* was investigated in this study. The observed ghrelin immunoreactivity of oocytes and embryos at all stages was predominantly in the cytoplasm. Relative real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR experiments confirmed that the ghrelin mRNA levels varied depending on the developmental stage, with the highest expression in the blastocyst, metaphase II (MII) oocytes, 2- and 8-cell stages had a significantly higher expression in the germinal vesicle (GV) oocytes, 4-stage and morula. Dynamic changes and the persistent presence of the ghrelin signaling system within oocytes and pre-implantation embryos opens up the possibility of a potential regulatory role of this novel molecule during oocyte maturation and embryonic development.

Key words: Ghrelin; Sheep oocytes; Embryos; Real time RT-PCR; Immunofluorescence staining

Ghrelin是1999年发现的一个内源性生长激素促分泌素受体的配体(Kojima et al, 1999), 含有28个氨基酸残基, 主要由胃组织的内分泌细胞所分泌。Ghrelin可促进GH释放、具有促进食欲、增加脂肪积聚、升高体重、调节能量代谢平衡的生理功能。自首次从大白鼠的胃组织中分离提取得到ghrelin以来, 研究者陆续发现在其他消化器官如十二指肠、

回肠、盲肠和结肠, 以及垂体、下丘脑和胰腺等处都有分布, 而在其他组织如肺、甲状腺、脂肪、肌肉、生殖器官等中也发现了ghrelin的存在。Ghrelin的普遍性分布充分说明其具有广泛的作用, 而其在生殖系统中的高表达也有力地证明了ghrelin在生殖系统中发挥着比较重要的作用。研究表明, 垂体ghrelin对两种促性腺激素的分泌有直接作用: LH的

收稿日期: 2008-01-09; 接受日期: 2008-03-05

基金项目: 国家自然科学基金(30660128); 内蒙古自然科学基金(200711020506)

*通讯作者 (Corresponding author): 男, 教授, 博士生导师, Tel:0471-4309202, E-mail:guifangcao@126.com

第一作者简介: 杜晨光 (1976-), 男, 讲师, 在读博士, 研究方向为组织胚胎学与发育生物学

反应受到抑制, FSH的反应得到增强(Furuta et al, 2001)。Ghrelin在卵巢中的表达, 证明其存在于具有类固醇生成活性的黄体细胞和间质门细胞中(Caminos et al, 2003)。性腺中ghrelin信号系统的存在提示这一新发现的分子在哺乳动物性腺功能的调控中具有调节作用。

至目前为止, 尚无关于绵羊卵母细胞和早期胚胎ghrelin表达的报道。为探明ghrelin mRNA和蛋白在绵羊卵母细胞及早期胚胎中的表达情况, 本实验采用实时定量RT-PCR技术和免疫荧光技术对绵羊体内产生卵母细胞和早期胚胎中的ghrelin mRNA相对表达量以及蛋白分布进行了研究, 以探索ghrelin对绵羊卵母细胞成熟及胚胎早期发育的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 体内卵母细胞和胚胎的获得

于内蒙古四子王旗赛诺牧场挑选发情期正常的1—2岁健康蒙古绵羊, 放置阴道海绵栓进行同期发情处理, 8天后以递减方式肌肉注射FSH和PMSG, 发情后肌肉注射LH进行超数排卵, 试情后确定发情时间。

手术法收集卵巢和成熟卵母细胞, 卵巢置于采卵液(PBS+2mg/mL BSA+5IU/mL 肝素)中, 切割法收集卵丘完整、形态一致的卵丘卵母细胞复合体, 经移液器反复吹打分离卵母细胞及卵丘细胞, 收集未成熟卵母细胞, 发情后24h自输卵管收集成熟卵母细胞。

采用公羊本交, 分别在授精后第24、48、60h自输卵管收集2细胞和4—8细胞胚胎, 第5—6天从子宫角回收桑椹胚和囊胚。用冻存管将收集到的卵母细胞及早期胚胎立即放置液氮中冻存, 以备提取RNA。同时将部分卵母细胞及不同发育阶段的胚胎用4%多聚甲醛4℃固定24h, 供免疫荧光检测。

1.2 RNA提取和反转录

采用RNAfast200(上海飞捷)微量RNA提取试剂盒按其说明进行RNA提取。因所获总RNA含量太低, 紫外分光光度计测不准, 反转录前直接将6.5μL的RNA加入到反转录体系中合成cDNA。反应体系为10μL, 其中PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5μL (TaKaRa DRR037S)、5×PrimeScript Buffer 2μL、Random 6mers (引物) 0.5μL、Oligo dT Primer (引物) 0.5μL。于PCR仪进行反转录, 反应条件为: 37℃

15min, 85℃ 5s。

1.3 实时定量PCR

根据跨内含子原则进行引物设计以避免基因组污染干扰。ghrelin(233 bp, GenBank accession no. AB060699)上游5'-GCAGAGAAAGGAACCTAAG-3'; 下游5'-GGGTTTCTTCGGCTTCTTC-3'; β-Actin(208 bp, GenBank accession no. U39357)上游5'-GTCACCAACTGGGACGACA-3'; 下游5'-AGG-CGTACAGGGACAGCA-3', 上海生工合成。

采用SYBR Green I荧光染料法进行实时定量PCR扩增的检测。PCR反应体系为20 μL, 其中2×SYBR premix EX TaqTM 10 μL (TaKaRa DRR041A)、上下游引物各0.4 μL (10 μmol/L)、cDNA 2 μL、dH₂O 7.2 μL。于实时定量PCR仪(美国MJ OPTICON-2)分别进行ghrelin和β-Actin的PCR反应, 扩增条件为: 95℃预变性30s; 95℃变性10s, 58℃退火15s, 72℃延伸10s, 45个循环后, 72℃延伸10min。反应过程中同时以绵羊胃组织cDNA为阳性对照, 以水替代cDNA为阴性对照。Ghrelin mRNA相对表达量采用2^{-ΔCT}进行计算(Schmittgen & Zakrajsek, 2000), $\Delta CT = CT_{ghrelin} - CT_{\beta-Actin}$ 。

1.4 PCR扩增产物特异性的确定

PCR产物经单一熔解曲线峰进行确定, 并取5 μL PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳(100v, 15min)确定扩增产物片段大小后, 送交上海生工进行序列测定。

1.5 免疫荧光染色

将固定好的卵母细胞和早期胚胎用PBS洗涤后放入PBS+0.2% Triton X-100中渗透1h, 然后用PBS+2% BSA洗涤三次; 封闭液(PBS+2% BSA+10%正常山羊血清+2%脱脂奶粉+0.15 mol/L 甘氨酸)中4℃封闭过夜, 用PBS+2% BSA洗涤后, 将卵母细胞和早期胚胎移入兔抗人 ghrelin 抗体(美国Phoenix)(1:300), 特异性抗体根据先前研究结果进行选择(Miller et al, 2005)。37℃下放置2h, PBS+2%BSA洗三次。移入FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(1:100), 37℃孵育1h。再用PBS缓慢摇动洗涤3—4次, 20 min/次; 放入5 μg/mL PI (Propidium iodide)中室温处理15min, PBS洗涤; 将卵母细胞和胚胎转移到封片液(PBS+2%甘油+100 mg/mL DABCO)中, 置于激光共聚焦显微镜(Bio-Rad MRC 1024ES)下扫描观察; 以不加一抗为阴性对照, 红色代表核, 绿色代表阳性着色。

1.6 统计分析

采用Spss软件进行单因子方差分析, 每组重复5

次, 每组5枚卵母细胞或早期胚胎, 图中所示不同字母表示 ghrelin mRNA 相对表达量差异显著 ($P<0.05$)。

2 结果

2.1 PCR产物特异性

扩增曲线表明扩增效果良好, 经熔解曲线分析 ghrelin (图 1A) 和 β -Actin (图 1B) 分别在 87°C 和 87.5°C 出现单一产物峰, 均与引物设计后预期产物 T_m 值相同。经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, ghrelin 和 β -Actin 在卵母细胞、胚胎和阳性对照组均出现与目的片段大小吻合的片段, 阴性对照没有出现任何条带。产物经测序后与已发表的序列同源为 99%, 表明 PCR 产物分别为 ghrelin 和 β -Actin 目的基因产物 (图 2)。

2.2 实时定量PCR检测ghrelin mRNA的变化

体内成熟卵母细胞 ghrelin mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$), 并一直维持到 2 细胞胚胎期, 然后在 4 细胞胚胎期显著下降 ($P<0.05$), 而后在 8

细胞胚胎期又显著升高 ($P<0.05$), 并在桑椹胚期呈最低表达, 在囊胚期呈显著升高 ($P<0.05$) (图 3)。

2.3 免疫荧光检测

Ghrelin蛋白的检测结果显示, 在未成熟卵母细胞, 以及体内成熟卵母细胞和体内胚胎早期发育过程均可检测到 ghrelin 蛋白的表达。未成熟和成熟卵母细胞以及4细胞以前早期胚胎绿色荧光主要分布于远离胚胎中心的细胞膜及膜下区域; 随着早期胚胎的发育, 8细胞期胚胎、桑椹胚和囊胚中绿色荧光分布于整个细胞质中, 呈广泛性分布。阴性对照没有检测到阳性信号 (图4)。

3 讨论

本研究结果表明绵羊卵母细胞和早期发育胚胎中持续表达 ghrelin mRNA 和蛋白。实时定量 RT-PCR 技术证实绵羊卵母细胞和早期发育胚胎 ghrelin mRNA 相对表达量随发育阶段的不同而变化; 免疫荧光技术显示阳性信号随着卵母细胞的成熟和胚胎的发育而逐渐增强, 这反映了在胚胎早期

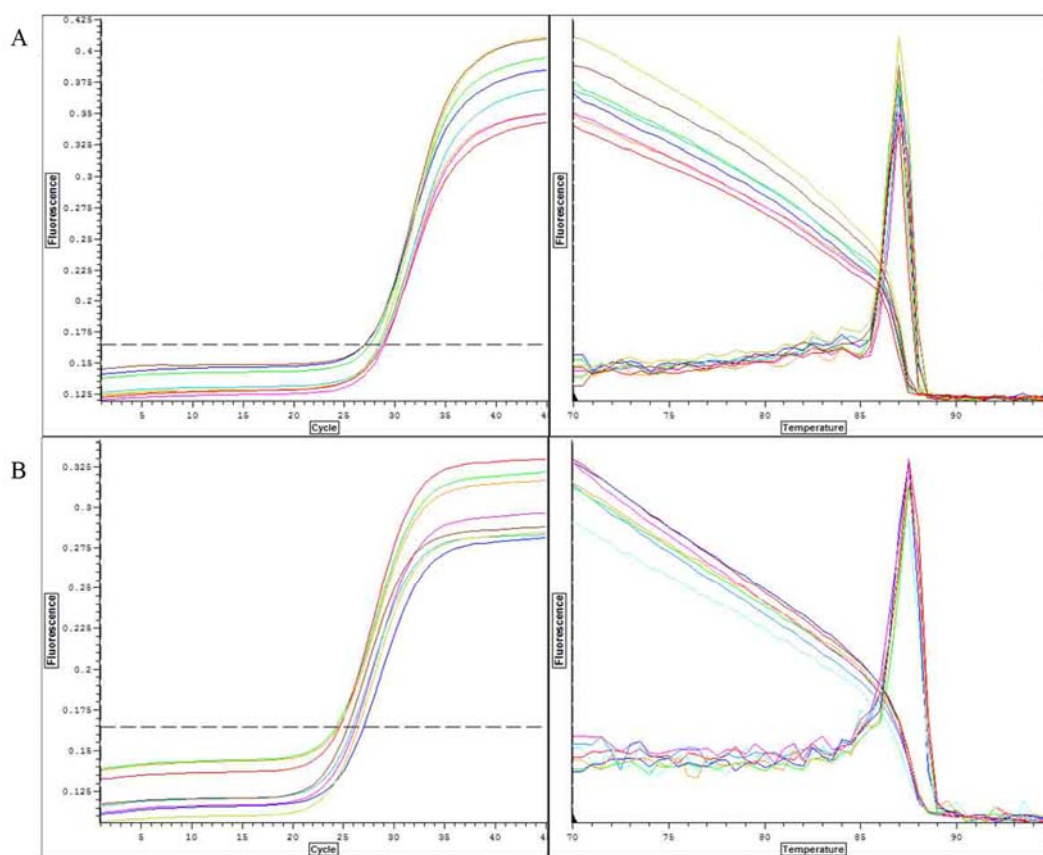
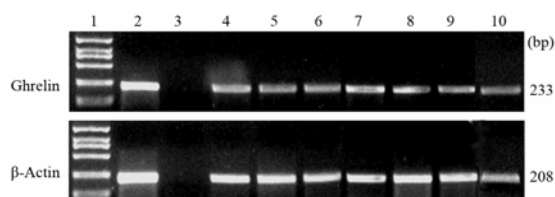


图 1 ghrelin (A) 和 β -Actin (B) 的扩增曲线及熔解曲线
Fig. 1 Amplification and melting curve analysis of ghrelin(A) and β -Actin(B)

图 2 电泳检测 ghrelin 和 β -Actin RT-PCR 产物Fig. 2 RT-PCR detection of ghrelin and β -Actin

1: DL2000 Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4: 未成熟卵母细胞; 5: 成熟卵母细胞; 6: 2 细胞; 7: 4 细胞; 8: 8 细胞; 9: 桑椹胚; 10: 囊胚。

1: Marker; 2: Positive control; 3: Negative control; 4: GV oocytes; 5: MII oocytes; 6: 2-cell; 7: 4-cell; 8: 8-cell; 9: Morula; 10: Blastocyst.

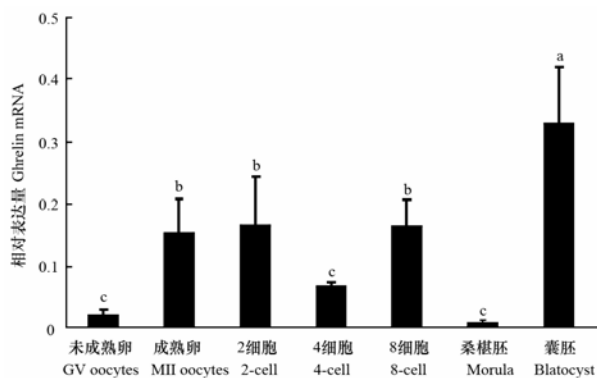


图 3 卵母细胞和早期胚胎 ghrelin mRNA 相对表达量

Fig. 3 Relative mRNA expression of ghrelin at various developmental stages of oocytes and embryos

图中所示不同字母表示有显著性差异, $a>b>c$, $P<0.05$ (Values in the figure with different lowercase letters indicating significant difference, $a>b>c$, $P<0.05$).

发育过程中 ghrelin 表达调控模式有其特定的规律。

目前关于卵母细胞和早期胚胎是否表达 ghrelin mRNA 仍少见报导, 且卵母细胞和早期胚胎中是否存在 ghrelin 蛋白, 也存有较大争议。处于不同发育阶段的成年绵羊卵泡颗粒细胞均有 ghrelin 蛋白表达, 而在卵母细胞内少有表达(Miller et al, 2005)。Ghrelin 蛋白也存在于人和大鼠的卵泡颗粒细胞中, 但均未发现其在卵母细胞中表达(Gaytan et al, 2003)。小鼠 ghrelin mRNA 和蛋白在桑椹胚才开始表达, 这种阶段性表达与其在妊娠早期过度的代谢消耗相协调(Kawamura et al, 2003)。本实验结果显示在绵羊卵母细胞和早期胚胎中存在 ghrelin mRNA 的表达, 揭示 ghrelin 可能参与了绵羊卵母细胞的成熟、受精及其后续胚胎的发育过程。哺乳动物早在卵子发生期间, 即在卵母细胞生长和成熟过程中已经开始准备并积累一套为胚胎发育所需的母型 mRNA 和蛋白质(Crosby et al, 1988)。在本研究中, 成熟前后绵羊卵母细胞中不仅表达 ghrelin 蛋白与 mRNA, 而且与成熟前相比, 成熟后卵母细胞中 ghrelin mRNA 相对表达量显著升高。有证据表明, ghrelin 在不同水平参与了细胞分化增殖, 甚至凋亡, ghrelin 在大鼠垂体细胞上通过 MAPK 通路促进细胞增殖(Nanzer et al, 2004)。据此我们推测, ghrelin 有可能通过卵母细胞广泛存在的 MAPK 通路参与卵母细胞成熟及胚胎后续发育的调控。

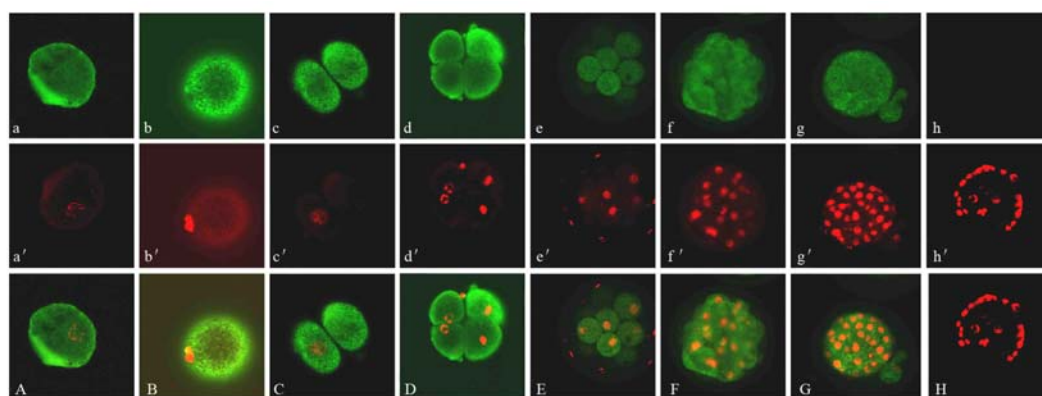


图 4 激光共聚焦扫描 ghrelin 蛋白在绵羊卵母细胞和早期胚胎中的表达

Fig. 4 Laser scanning confocal microscopy images of ghrelin expression in sheep

a-f: ghrelin 蛋白 (绿); a'-f': 核 (红); A-F: 合成图; a,a',A: 未成熟卵母细胞; b,b',B: 成熟卵母细胞; c,c',C: 2 细胞; d,d',D: 4 细胞; e,e',E: 8 细胞; f,f',F: 桑椹胚; g,g',G: 囊胚; h,h',H: 囊胚阴性对照; 放大倍数为 40 \times , Zoom 为 1.5。

a-f: ghrelin protein (green); a'-f': nuclei (red); A-F: ghrelin (green) and nuclei (red) merged images. a,a',A: GV oocytes; b,b',B: MII oocytes; c,c',C: 2-cell; d,d',D: 4-cell; e,e',E: 8-cell; f,f',F: Morula; g,g',G: blastocyst; h,h',H: negative control of blastocyst; The magnification was 40 \times , with a zoom of 1.5.

哺乳动物最早期的胚胎发育受母源mRNA和蛋白质控制(Schultz, 1993)。在1—3次卵裂后, 胚胎发育开始受控于胚胎基因组, 这时, 母源的mRNA开始逐步降解和消失(De et al, 1998; Telford et al, 1990; Watson et al, 1999)。牛胚胎基因组在第1和第2个细胞周期中都发生较微弱的转录(Hyttel et al, 1996), 而到第4细胞周期时开始大量转录。另外, 牛胚胎从受精到82细胞阶段蛋白质合成能力逐渐下降, 而从82细胞到囊胚阶段, 蛋白质合成能力又开始逐渐上升(Fair et al, 1997)。这说明牛胚胎在82细胞期以前蛋白质合成可能主要来自母源mRNA, 而在82细胞到囊胚阶段, 蛋白质的合成开始受胚胎

mRNA控制。本实验中ghrelin mRNA表达水平呈现在4细胞期胚胎中下降, 而8细胞期胚胎中显著升高的趋势, 表明ghrelin可能对胚胎基因组的激活有重要作用, 同时囊胚ghrelin mRNA表达量显著升高, 可能与囊胚腔的形成和扩展有关。本实验结果还表明ghrelin可能参与了母型调控向合子型调控过渡的基因表达。

本研究首次揭示绵羊卵母细胞与早期胚胎表达ghrelin mRNA和蛋白, 而且其mRNA表达水平呈现出特定的动力学变化规律, 表明这一新型分子在卵母细胞成熟以及胚胎早期发育过程中具有潜在的调控作用。

参考文献:

- Camino JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C. 2003. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary [J]. *Endocrinology*, **144**(4):1594-1602.
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos [J]. *J Reprod Fertil*, **82**(2):769-775.
- De SP, Watson AJ, Schultz GA, Bilodeau-Goeseels S. 1998. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review [J]. *Mol Reprod Dev*, **51**(1): 112-121.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles [J]. *Mol Reprod Dev*, **46**(2): 208-215.
- Furuta M, Funabashi T, Kimura F. 2001. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**(4): 780-785.
- Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. 2003. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**(2): 879-887.
- Hyttel P, Viuff D, Avery B, Laurincik J, Greve T. 1996. Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos [J]. *J Reprod Fertil*, **108**(2): 263-270.
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T. 2003. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro [J]. *Endocrinology*, **144**(6): 2623-2633.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, **402**(6762): 656-660.
- Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL, Lea RG. 2005. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, **3**: 60.
- Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M. 2004. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Eur J Endocrinol*, **151**(2): 233-240.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR [J]. *J Biochem Biophys Methods*, **46**(1-2): 69-81.
- Schultz RM. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse [J]. *Bioessays*, **15**(8): 531-538.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species [J]. *Mol Reprod Dev*, **26**(1): 90-100.
- Watson AJ, Westhusin ME, De SP, Betts DH, Barcroft LC. 1999. Gene expression regulating blastocyst formation [J]. *Theriogenology*, **51**(1): 117-133.